Aus dem zahnärztlichen Universitäts-Institut „Carolinum"
zu Frankfurt am Main; Direktor Professor Dr. O. Loos

Ueber Methoden zur Bestimmung des Glutathions in biologischen Flüssigkeiten.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
EUGEN SCHLEISS
Zahnarzt aus Seligenstadt/Hessen

April 1935

Frankfurt am Main
Buchdruckerei Otto E. Schröder

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Das Glutathion, ein Tripeptid aus Glutaminsäure, Cystein und Glykokoll, bildet bekanntlich eine lange Zeit übersehene prinzipielle Fehlerquelle bei allen jodometrischen Rhodanbestimmungsmethoden, die auf dem Prinzip von *Rupp* und *Schied*[1]) (Titration des als AgCNS gefällten Rhodanions mit Jod in bicarbonatalkalischer Lösung) beruhen. In der Zeitschrift „Mikrochemie"[2]) ist vor einiger Zeit ein Verfahren angegeben worden, das es ermöglicht, das Rhodan vom Glutathion zu trennen und maßanalytisch zu bestimmen. Die Anwendung dieses Verfahrens auf Serum und Speichel hat gezeigt, daß die wahren Rhodanwerte viel niedriger liegen, als früher angenommen wurde[3]) und daß also in diesen biologischen Flüssigkeiten wahrscheinlich recht beträchtliche Mengen von Glutathion enthalten sind; es schien mir infolgedessen eine lohnende Aufgabe, ein zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung des Glutathions auszuarbeiten und den Glutathiongehalt von Blut, Serum und Speichel zu ermitteln.

1. Theoretischer Teil.

Zur Bestimmung des von *Hopkins* entdeckten Tripeptids Glutathion (Glutaminyl-Cysteinyl-Glycin)

$$\begin{matrix} HOOC-CH(NH_2)-C_2H_4-CO-NH \\ HOOC-CH_2-NH-CO \end{matrix}\!\!\rangle Ch-CH_2SH$$

sind zahlreiche Verfahren vorgeschlagen worden (eine Zusammenstellung derselben findet sich z. B. bei *Lorant*[4]). Soweit diesen nicht eine vollständige Zerstörung der organischen Substanz auf oxydativem Wege und Wägung des dabei entstehenden SO_4''-Ions als $BaSO_4$ zugrunde liegt, beruhen sie durchwegs auf einer Titration der Sulfhydrylgruppe des Glutathions mit Jodlösung, wobei die Annahme gemacht wird, daß die Umsetzung zwischen Glutathion und Jod quantitativ im Sinne der Gleichung [5])

---

[1]) B. 35, 2191 (1902).
[2]) Mikrochemie 16, 141 (1934); Fußnote S. 147.
[3]) Dissertation Amter, Frankfurt a. M. 1934.
[4]) Zeitschr. physiol. Chem. 200, 121 (1931).
[5]) Da es im Folgenden nur auf die Sulfhydrylgruppe ankommt, wird der Kürze halber der Rest

$$\begin{matrix} HOOC-CH(NH_2)-CH_2-CO-NH \\ HOOC-CH_2-NH-CO \end{matrix}\!\!\rangle CH-CH_2-(=C_{10}H_{16}O_6N_3)$$

weiterhin als R bezeichnet werden.

$$2\,R{-}SH + J_2 = R{-}S{-}S{-}R + 2\,HJ$$

verlaufe. Vor längerer Zeit hat aber *Okuda* darauf hingewiesen,[6]) daß diese Annahme nicht zutrifft, sondern daß Glutathion mit Jod nach zwei Richtungen reagieren kann, nämlich

$$\text{(I)}\quad 2\,R{-}SH + J_2 = R{-}S{-}S{-}H + 2\,HJ \text{ und}$$

$$\text{(II)}\quad R{-}SH + 3\,J_2 = R{-}SO_3H + 6\,HJ + 3\,H_2O$$

und daß es nicht ohne weiteres gelingt, die Reaktion so zu leiten, daß sie ausschließlich im Sinne der Gleichung (I) abläuft.

Selbst wenn dies aber möglich wäre, so haftet doch allen jodometrischen Bestimmungsmethoden der grundsätzliche Nachteil an, daß an der Reaktion nur der Bruchteil des vorhandenen Glutathions teilnehmen kann, der jeweils in der Form des Sulfhydrats vorliegt. Bekanntlich ist aber Glutathion in der Nähe des Neutralpunkts ziemlich empfindlich gegen Sauerstoff (worauf ja seine Bedeutung als Oxydations-Reduktions-Katalysator im lebenden Organismus beruht); es hängt infolgedessen lediglich von zufälligen Umständen ab, ein wie großer Bruchteil des in einer biologischen Flüssigkeit enthaltenen Glutathions jeweils in Gestalt des Disulfids vorhanden ist und damit der Bestimmung entgeht.

Wir haben zunächst die Reaktion zwischen Glutathion und Jod eingehend untersucht, um festzustellen, ob es möglich ist, die Umsetzung zwischen Glutathion und Jod so zu leiten, daß sie ausschließlich von der Sulfhydrytform aus abläuft. Dies erwies sich als unmöglich.

Dagegen zeigte es sich, daß Glutathion mit nascierendem Brom innerhalb weniger Minuten quantitativ unter Bildung der Sulfosäure nach der Gleichung

$$R{-}SH + 3\,Br_2 + 3\,H_2 = R{-}SO_3H + 6\,HBr$$

reagiert, und daß auch die dehydrierte (Disulfid-) Form des Glutathions der ganz analogen Umsetzung

$$R{-}S{-}S{-}R + 5\,Br_2 + 6\,H_2O = 2\,R{-}SO_3H + 10\,HBr$$

fähig ist.

Wie aus den beiden Gleichungen hervorgeht, verbraucht ein Molekül Glutathion als Sulfhydrat 6 Atome Brom, als Disulfid dagegen deren fünf. Selbst in dem ungünstigsten Falle, daß alles Glutathion als Disulfid vorliege und als Sulfhydrat berechnet würde, könnte der dadurch bedingte Fehler also höchstens $^1/_6$ oder 16,7% ausmachen. Mit dieser Möglichkeit ist aber praktisch

---

[6]) Zit. bei Lorant

nicht zu rechnen. Ueberdies ist es, wie noch gezeigt werden wird, unschwer möglich, das gesamte vorhandene Glutathion vollständig in die Form des Disulfids oder in die Form des Sulfhydrats überzuführen.

Die Titration des Glutathions mit nascierendem Brom setzt voraus, daß das in biologischem Material enthaltene Glutathion zunächst isoliert wird. Wenn auch mit einiger Annäherung die Annahme von Tunnicliffe zutreffen mag, daß Jod in mit Trichloressigsäure enteiweißten Flüssigkeiten praktisch nur das Glutathion oxydiere, so ist doch mit Sicherheit anzunehmen, daß ein so energisches Oxydationsmittel wie nascierendes Brom sofort alle vorhandenen oxydablen Substanzen angreift und daß infolgedessen bei dem Versuch einer Titration ohne vorhergehende Isolierung viel zu hohe Werte erhalten würden.

Zur Isolierung des Glutathions bieten sich zwei Möglichkeiten:

1. Wie *Fujita* und *Iwatake* gezeigt haben[7]) bildet Glutathion ein in Wasser sehr schwer lösliches Cadmiumsalz und ist infolgedessen mit Cadmium fällbar. Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß die Schwerlöslichkeit des Glutathion-Cadmiums an sich zwar nicht zur quantitativen Fällung des Glutathions aus stark verdünnten Lösungen ausreicht, daß das Glutathion aber auch in den höchsten Verdünnungen von Cadmiumhydroxyd (wie auch von verschiedenen anderen Hydroxyden) vollkommen adsorbiert wird und sich auf diese Weise quantitativ ausfällen läßt.

2. Die Silbersalze des Glutathions sind zwar in Säuren (sogar in verdünnter Essigsäure) leicht löslich;[8]) jedoch wird Glutathion von Halogensilber sogar in salpetersaurer Lösung quantitativ adsorbiert.[9]) (Auf einige sehr auffallende Beobachtungen, die bei der Untersuchung der Fällung des Glutathions durch Adsorption an Halogensilber gemacht wurden, wird im experimentellen Teil eingegangen werden.)

Was die Verwertbarkeit dieser beiden Fällungsmöglichkeiten zur Trennung des Glutathions von Begleitsubstanzen anlangt, so leuchtet ein, daß das Glutathion zwar von Rhodan getrennt wird, weil Cadmiumrhodanid wasserlöslich ist, nicht aber von

---

[7]) Biochem. Zeitschr. 242, 43 (1931).

[8]) Nicht veröffentlichte Versuche.

[9]) Eine Untersuchung der Frage, ob es sich bei diesem Vorgang wirklich um eine Adsorption handelt oder ob etwa ein Komplexsalz gebildet wird, lag außerhalb des Rahmens meiner Arbeit.

Harnsäure und von Hexose-Phosphorsäure, weil diese ebenfalls schwerlösliche Cadmiumsalze bilden. Die Fällung nach 9 mit Silberhalogenid in stark saurer (salpetersaurer oder schwefelsaurer) Lösung scheidet dagegen das Glutathion von allen anderen in Betracht kommenden Substanzen mit einziger Ausnahme[10]) von Rhodan.

Es schien deshalb naheliegend und aussichtsreich, durch Kombination dieser beiden Fällungsmöglichkeiten eine vollständige Isolierung des Glutathions von allen anderen in Betracht kommenden reduzierenden Substanzen zu bewirken. Ueberraschender Weise zeigte sich aber, daß diese Möglichkeit nicht besteht. Es ist nämlich weder möglich, zuerst die Silberchloridfällung vorzunehmen und an diese Fällung mit Cadmium anzuschließen (weil sich das an Silberchlorid adsorbierte Glutathion auf keine Weise wieder in Lösung bringen läßt), noch kann man in der sauren Lösung des Cadmiumhydroxyd-Niederschlages die Adsorption des Glutathions an Silberchlorid vornehmen, weil diese in Gegenwart von Cadmiumsalzen nicht mehr quantitativ vor sich geht. Versetzt man nämlich eine (stark oder schwach saure) natriumchlorid-haltige Glutathionlösung mit Cadmiumsulfat und fällt nunmehr mit einem Silbersalz, so bleibt immer ein sehr erheblicher Bruchteil des Glutathions in Lösung (je nach den Bedingungen 30—50%). Es ist aber nicht möglich, an Silberchlorid adsorbiertes Glutathion durch Behandlung mit Cadmiumsulfat wieder in Lösung zu bringen, — auch nicht, wenn man das glutathion-haltige Silberchlorid mehrmals mit Cadmiumsulfat behandelt. Cadmiumsulfat stört also zwar die Adsorption des Glutathions an Silberchlorid, macht aber die einmal eingetretene Adsorption trotzdem nicht rückgängig, auch nicht in der Hitze.

Je nach der Zusammensetzung des Untersuchungsmaterials muß man also entweder die eine oder die andere Möglichkeit, das Glutathion zu fällen und damit von der Mehrzahl seiner Begleitsubstanzen zu isolieren, in Anwendung bringen. Im rhodanarmen Milieu ist prinzipiell die Silberchloridfällung vorzuziehen; in rhodanreichen Flüssigkeiten wird man sich dagegen der Fällung mit Cadmium bedienen. Vergleiche beider Verfahren haben ergeben, daß man in den meisten biologischen Flüssigkeiten nach

[10]) Ob durch die Fällung mit Halogensilber das Glutathion auch von Ergothionein getrennt wird, konnte ich nicht untersuchen, da es mir nicht gelang, Ergothionein im Handel zu erhalten. Das Cadmiumsalz des Ergothioneins ist nach Fujita und Iwatake ebenso wie das des Glutathions schwer löslich in Wasser.

beiden Methoden fast[11]) dieselben Resultate erhält, was ja auch in Anbetracht des geringen Gehaltes biologischer Flüssigkeiten (insbesondere von Blut und Serum) an in Betracht kommenden reduzierenden Fremdsubstanzen zu erwarten war. Nur im Speichel erhält man infolge seines hohen Rhodangehaltes bei der Fällung mit Silberchlorid viel höhere Glutathionwerte, als nach der Fällung mit Cadmiumhydroxyd. Bestimmt man aber den Rhodangehalt im Speichel gesondert und bringt ihn in Abzug, so kommt man auch in diesem Falle zu fast demselben Ergebnis, wie auf dem Wege der Isolierung des Glutathions durch Fällung mit Cadmiumhydroxyd.

Im Gegensatz zu der Fällung des Glutathions mit Silberchlorid läßt sich die mit Cadmiumhydroxyd einer Mikromethode zugrunde legen, was die Durchführung einer Glutathionsbestimmung mit nur 0,05—0,1 ccm Blut ermöglicht. Hierauf wird im methodischen Teil noch eingegangen werden.

2. Experimenteller Teil.

1. Glutathion und Jod.

Bekannte Mengen Glutathion wurden in ca. 5 ccm dest. Wasser gelöst und mit überschüssiger n/200-Jodjodkalilösung versetzt; das unverbrauchte Jod wurde nach 5 Minuten zurücktritriert

I. 0,5 mg Glut. (Mol.-Gew. = 307) verbrauchten 0,82 ccm n/200 Jod
II. 1,0 mg Glut. verbrauchten 1,25 ccm n/200 Jod.

Aus I. errechnet sich ein Jodverbrauch von 2,52 Atomen Jod pro Molekül Glutathion, aus II. ein solcher von 1,92 Atomen Jod pro Molekül Glutathion.

Zur Prüfung des Einflusses der Reaktionsdauer wurden dreimal je 0,5 mg Glutathion in ca. 20 ccm dest. Wasser gelöst mit überschüssiger n/200-Jodlösung versetzt und das unverbrauchte Jod nach 15, 30 und 90 Minuten zurücktitriert.

I. 0,5 mg Glut. = 0,41 ccm n/200-Jod nach 15 Minuten
II. 0,5 mg Glut. = 0,44 ccm n/200-Jod nach 30 Minuten
III. 0,5 mg Glut. = 0,49 ccm n/200-Jod nach 90 Minuten.

Aus I. 1 Molekül Glutathion = 1,26 Atome Jod
II. 1 Molekül Glutathion = 1,35 Atome Jod
III. 1 Molekül Glutathion = 1,51 Atome Jod.

Aus diesen beiden Versuchsreihen ergibt sich als Nebenbefund, daß der Jodverbrauch pro Molekül Glutathion mit zu-

[11]) Vergl. auch die Tabelle auf Seite 18.

nehmender Verdünnung der Lösung abnimmt, bzw. daß sich das Gleichgewicht in verdünnten Lösungen nur sehr langsam einstellt.

Aehnliche Resultate, wie bei den angegebenen Versuchen wurden in phosphat-gepufferten schwach sauren und schwach alkalischen Lösungen erhalten. Es gelang nicht, Bedingungen zu finden, unter denen sich ein Molekül Glutathion mit nur einem (oder mit 6) Atomen Jod reagiert oder unter denen wenigstens einigermaßen konstante und reproduzierbare Jodmengen verbraucht wurden. Die Untersuchungen in dieser Richtung wurden deshalb als aussichtslos aufgegeben.

2. Glutathion und nascierendes Brom.

Bekannte Mengen Glutathion wurden in wässeriger Lösung mit einigen Tropfen Natriumbromid-Lösung und bekannten Mengen n/1000-Kaliumbromat versetzt und mit Salzsäure stark angesäuert. Nach 8 Minuten wurde das Reaktionsgemisch mit sekundärem Natriumphosphat, etwas festem Jodkali und einigen Tropfen Stärke versetzt und das ausgeschiedene Jod mit Thiosulfat titriert.[12])

Ergebnisse:

0,5 mg Glut. verbr. die 1,96 ccm n/200-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.
1,0 mg Glut. verbr. die 3,90 ccm n/200-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.
0,4 mg Glut. verbr. die 1,56 ccm n/200-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.
0,2 mg Glut. verbr. die 0,79 ccm n/200-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.
2,1 mg Glut. verbr. die 8,21 ccm n/200-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.

Aus diesen Versuchen ergibt sich ein Bromverbrauch von genau 6 Atomen Brom pro Molekül Glutathion.

Dieselben Resultate wurden bei Versuchen mit kleinen Mengen Glutathion erhalten, wobei mit n/10.000-Kaliumbromat oxydiert und mit n/1000-Thiosulfat zurücktitriert wurde:

---

[12]) Dieses von Treadwell und Mayr (F. P. Treadwell, Lehrb. d. analyt. Chemie, 8. Aufl., Bd. 2, S. 600) herrührende Oxydationsverfahren ist bereits zur Bestimmung kleinster Rhodanmengen benutzt worden. Es sei hier darauf hingewiesen, daß es sich zur Bestimmung aller möglichen reduzierenden Substanzen eignet, da es bei schneller Durchführbarkeit sehr präzise Werte liefert. So haben gelegentliche Versuche ergeben, daß sich z. B. Harnsäure mit großer Schärfe durch Oxydation mit naszierendem Brom bestimmen läßt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sich auch die von R. Berg in die Mikrochemie eingeführten Komplexsalze des Thionalids ($C_{10}H_7 . NH . CO . CH_2 . S . H$)) auf dieselbe Weise titrimetrisch bestimmen lassen werden. Untersuchungen in dieser Richtung sind zurzeit im Gange.

0,05 mg Glut. verbr. die 0,98 ccm n/1000-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.
0,02 mg Glut. verbr. die 0,39 ccm n/1000-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.
0,01 mg Glut. verbr. die 0,20 ccm n/1000-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.
0,08 mg Glut. verbr. die 1,57 ccm n/1000-$Na_2S_2O_3$ äquiv. Menge Br.

Auch daraus folgt ein Verbrauch von 6 Atomen Brom pro Molekül Glutathion. Es entspricht also 1 ccm n/200 Thiosulfat $\frac{307}{200 \cdot 6} = 0{,}256$ mg Glutathion, 1 ccm n/1000 Thiosulfat 0,0512 mg Glutathion.

3. Fällung des Glutathions mit Cadmiumhydroxyd.

Obgleich Cadmiumsalze in verdünnten Glutathionlösungen keinen Niederschlag hervorbringen, wird Glutathion quantitativ mit ausgefällt, wenn man mit Cadmiumsulfat versetzt und eine zur Fällung des gesamten Cadmiums nicht ausreichende Menge Natronlauge zugibt: Bekannte Mengen Glutathion wurden in 10 ccm Wasser gelöst; diese Lösung wurde mit 5 ccm 5%igem Cadmiumsulfat und 1,3 ccm n/1-Natronlauge versetzt, der Niederschlag nach kurzem Stehen filtriert, ausgewaschen (es erwies sich als vorteilhaft, nicht mit Wasser, sondern mit einer ganz verdünnten Cadmiumsulfatlösung auszuwaschen), in 5 ccm n/2-Salzsäure gelöst, und das Filter mit 10 ccm Wasser nachgewaschen. Zu der salzsauren Lösung wurden einige Tropfen n/1-Natriumbromid und 3 ccm n/1000 Kaliumbromat zugegeben und das Gefäß sofort gut verschlossen. Nach 8 Minuten wurde die freie Salzsäure mit 2,5 gesättigter sekundärer Natriumphosphatlösung abgepuffert, etwas Jodkali und Stärke zugegeben und das unverbrauchte Brom mit Thiosulfat zurücktitriert. Dabei wurden folgende Resultate erhalten:

Gegeben: 0,20 0,40 0,50 0,60 mg Glutathion.
Gefunden: 0,19 0,39 0,51 0,59 mg Glutathion.

Zur Kontrolle wurden auch die Filtrate von Cadmiumhydroxyd samt den Waschflüssigkeiten mit Natriumbromid und Kaliumbromat versetzt, mit Salzsäure angesäuert und wie oben angegeben, titriert. Der Thiosulfatverbrauch war in allen Fällen derselbe wie bei Leerversuchen, es war also alles Gluthion durch das Cadmiumhydroxyd ausgefällt worden.

Auch in den höchsten Verdünnungen wird Glutathion durch Cadmiumhydroxyd quantitativ gefällt, wie folgende Versuche zeigen:

Glutathion in Mengen von 0,01—0,05 mg wurden in 10 ccm

Wasser gelöst, diese Lösung mit 2 ccm 5%igem Cadmiumsulfat und 0,4 n/1-Natronlauge versetzt und weiter verfahren, wie oben angegeben; zur Lösung des Cadmiumhydroxyds wurden aber nur 3 ccm 2 n-Salzsäure und 3 ccm Wasser benutzt, um nicht zu große Flüssigkeitsmengen zu erhalten. Die Oxydation wurde in diesem Falle mit n/10.000 Kaliumbromat vorgenommen und das unverbrauchte Brom mit n/1000 Thiosulfat titriert.

Gegeben: 0,01 0,02 0,03 0,04 0,05 mg Glutathion,
Gefunden: 0,011 0,019 0,028 0,04 0,051 mg Glutathion.

Auf eine Kontroll-Titration der Filtrate wurde in diesem Falle verzichtet.

4. Verhalten von Glutathion gegenüber Halogensilber.

Fällt man eine glutathionhaltige Kochsalzlösung in neutralem oder saurem Milieu mit einem Silbersalz, so ist die merkwürdige Erscheinung zu beobachten, daß das Silberchlorid nicht in flockiger Form ausfällt, sondern einen sandigen Niederschlag bildet, der sich auf keine Weise zur Koagulation bringen läßt, sich nur sehr langsam und unvollkommen absetzt und große Neigung zeigt, beim Filtrieren trübe durchs Filter zu laufen. In gleicher Weise wie AgCl verhält sich auch AgBr und selbst fertig gebildetes und bereits zusammengeballtes Halogensilber geht auf Zusatz von etwas Glutathion alsbald in die feinpulvrig-sandige Form über. Dabei wird das Glutathion quantitativ an das Halogensilber adsorbiert; im Filtrat vom Silberchlorid ist keine Spur von Glutathion nachweisbar.

Bei dem Versuch, das an das Silberchlorid adsorbierte Glutathion durch Oxydation mit Brom zu bestimmen, stieß ich auf große Schwierigkeiten. Zunächst wurden Natriumchloridhaltige Glutathionlösungen in salpetersaurer (oder schwefelsaurer oder essigsaurer) Lösung mit Silbernitrat gefällt, das Silberchlorid ausgewaschen, durch Behandlung mit Natriumbromid in Silberbromid übergeführt, Bromat und Salzsäure zugesetzt, nach 8 Minuten mit einem großen Ueberschuß an Jodkali versetzt(um alles Silberbromid in Silberjodid zu überführen) und das unverbrauchte Brom (bzw. Jod) mit Thiosulfat zurücktitriert. Ich erhielt dabei immer nur etwa 70—75% zugesetztes Glutathion, konnte aber trotzdem in den Filtraten vom Silberchlorid und den Waschflüssigkeiten niemals Glutathion nachweisen. Versuche unter den verschiedensten Bedingungen

führten zu dem Ergebnis, daß Glutathion durch Salpetersäure (auch wenn sie durch Kochen mit Harnstoff nitritfrei gemacht ist) und überhaupt durch NO_3-Ion nicht nur dehydriert, sondern anscheinend in anderer Weise tiefgehend angegriffen wird: Versetzt man eine bekannte Menge in Wasser gelöstes Glutathion mit Natriumbromid, Salpetersäure und Kaliumbromat und titriert nach einigen Minuten zurück, so findet man immer viel zu niedrige Zahlen; im Mittel erhält man nur 75% der Einwaage wieder; arbeitet man dagegen ganz analog mit anderen starken Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure), so werden die richtigen Werte[13]) gefunden. Der Versuch, das Silberchlorid und damit auch das Glutathion statt in salpetersaurer in schwefel- oder phosphorsaurer Lösung auszufällen, ergab kein besseres Resultat. Es wurden immer schwankende Werte erhalten, die sich in der Gegend von 70—75% bewegten. Dieses Ergebnis, das offenbar auf das NO_3-Ion des zur Fällung des Silberchlorids benutzten Silbernitrats zurückzuführen war, legte den Gedanken nahe, im ganz nitrat-freien Milieu zu arbeiten. Ich benützte deshalb das Silberlactat, von dem sich in der Wärme leicht n/1-Lösungen herstellen lassen, die auch in der Kälte in übersättigtem Zustand recht beständig sind, namentlich wenn man sie kräftig mit Milchsäure ansäuert.

Bei der Titration des aus stark schwefelsaurer Lösung in Gegenwart von Glutathion aus Natriumchlorid und Silberlactat erzeugten AgCl-Niederschlages erhielt ich nun mit großer Konstanz 83—84% (also im Mittel $^5/_6$ = 83,3%) der Einwaage wieder; ein Ergebnis, das sich kaum anders deuten läßt, als daß bei der Fällung das Glutathion dehydriert wird. Um eine Oxydation des Glutathions während des Auswaschens durch den Sauerstoff der Luft handelt es sich zweifellos nicht; ebensowenig um eine Dehydrierung durch im Wasser gelösten Sauerstoff. Arbeitet man nämlich mit ausgekochten Lösungen und titriert den Niederschlag sofort nach seiner Erzeugung in der Fällungsflüssigkeit, also ohne ihn erst auszuwaschen oder sonstwie der Luft auszusetzen, so erhält man ebenfalls nur 83% der Einwaage wieder, wie folgendes Beispiel zeigt: Ein Gemisch von 3 ccm n/1-Natriumchlorid, 10 ccm Wasser, 0,05 mg Glutathion und 6 ccm n/1-Schwefelsäure wurde mit 4 ccm n/1 Silberlactat gefällt. Sofort nach der Fällung wurden zu dem Reaktions-

[13]) Ein Ergebnis von 75% würde auf eine Reaktion deuten, bei der sich ein Molekül Glutathion auf 4½ Atomen Brom umsetzt; dafür läßt sich aber keine theoretische Deutung geben.

gemisch 5 ccm n/1-Natriumbromid und 3 ccm m/1000-Kaliumbromat gegeben und der Kolben verschlossen; nach 8 Minuten wurde mit sekundärem Natriumphosphat abgepuffert und nach Zugabe von 1,5 gr Jodkali und 20 Tropfen Stärke mit Thiosulfat titriert. Verbrauch: 1,99 ccm n/200-Thiosulfat. Ein analog behandelter Leerversuch verbrauchte 3,61 ccm n/200-Thiosulfat. Daraus folgt: 3,61—1,99 = 1,62 ccm n/200-Thiosulfat; 1,62 . 0,256 = 0,0413 mg Glutathion = 82,6%.

Der Befund, daß das Glutathion bei der Fällung des Silberchlorids und Adsorption an dieses dehydriert wird, hat sich an einer großen Zahl von Versuchen bestätigen lassen.[14])

Für die analytische Anwendung des Prozesses ist diese Erscheinung nur vorteilhaft; es wird auf diese Weise alles Glutathion in die Form des Disulfids überführt, einerlei, ob es vorher ganz oder teilweise als Sulfhydrat vorgelegen hat.

5. Beeinflussung der Adsorption an Silberchlorid durch Cadmiumsulfat.

Wie bereits erwähnt, schien es naheliegend, im biologischen Material enthaltenes Glutathion zunächst mit Cadmiumhydroxyd zu fällen, diesen Niederschlag in Schwefelsäure zu lösen, in dieser Lösung einen Niederschlag von Silberchlorid zu erzeugen und das an diesem Niederschlag adsorbierte Glutathion titrimetrisch zu bestimmen. Bei Versuchen mit eingewogener Glutathion wurden aber viel zu niedrige Werte erhalten. Eine Erklärung hierfür konnte nur in einer Störung der Adsorption des Glutathions an Silberchlorid durch das Cadmiumsulfat gesucht werden. Daß dies tatsächlich der Fall ist, zeigen folgende Versuche: 0,4 mg Glutathion in 10 ccm Wasser und 3 ccm n/1-Natriumchlorid wurden mit 5 ccm 5%igem Cadmiumsulfat und 5 ccm n/1-Schwefelsäure versetzt und mit 5 ccm n/1-Silberlactat gefällt. Nach kurzem Stehen wurde die über dem Halogensilber stehende Flüssigkeit abdekantiert, mit 5 ccm Natriumbromid und 3 ccm m/1000-Kaliumbromat versetzt und wie beschrieben titriert. Sie zeigte einen Gehalt von 0,16 mg Glutathion. Die Titration des ausgewaschenen Halogensilberniederschlags ergab dementspre-

[14]) Setzt man aber das Glutathion dem Reaktionsgemisch erst nach der Fällung des Silberchlorids zu, so erhält man 100% der Einwaage wieder. Die Dehydrierung erfolgt also während des Fällungsprozesses. Eine theoretische Deutung dieser Erscheinung vermag ich nicht zu geben.

chend, daß von den gegebenen 0,4 mg Glutathion nur 0,25 mg absorbiert worden waren.

Ganz ähnliche Ergebnisse wurden bei Variation der Cadmiumsulfatmenge und der Acidität der Fällungsflüssigkeit erhalten; es erwies sich als unmöglich, Bedingungen aufzufinden, unter denen die adsorptive Fällung des Glutathions mit Silberchlorid auch in Gegenwart von Cadmiumsulfat quantitativ verläuft.

Andererseits ist es aber nicht möglich, glutathionhaltigem Silberchlorid das Glutathion ganz oder teilweise durch Behandlung mit Cadmiumsulfat wieder zu entziehen: In einer Reihe von Versuchen wurden mit bekannten Mengen Glutathion beladenes Silberchlorid längere Zeit mit saurem und neutralem Cadmiumsulfat Lösungen verschiedener Konzentration sowohl in der Kälte als auch auf dem Wasserbad behandelt und in den vom Silberchlorid abgegossenen Flüssigkeiten der Glutathion-Gehalt bestimmt. Sie erwiesen sich ausnahmslos als glutathionfrei; die Kontrollbestimmungen des am Silberchlorid verbliebenen Glutathions ergaben immer die Einwaage wieder.

3. Methodischer Teil.

A. Makromethoden.

1. Isolierung des Glutathions mittels Cadmiumhydroxyd.

Erforderliche Lösungen: 20%ige Trichloressigsäure, 4%ige Natronlauge (= n/1), 5% Cadmiumsulfatlösung (5 gr $CdSo_4$ mal $^8/_3$ H_2O in 100 ccm Wasser), ca. 2/n-Salzsäure (20 ccm 38%ige Salzsäure vom spez. Gew. 1,19 mit Wasser auf 100 ccm verdünnt), 10%ige Bromnatriumlösung (10 g Nariumbromid in 100 ccm Wasser gelöst), m/1000-Kaliumbromatlösung (0,167 g Kaliumbromat im Liter), kaltgesättigte Na_2HPO_4-Lösung, Stärke-Kochsalzlösung (vgl. Mikrochemie XVI, S. 147, Fußnote), n/200-Thiosulfat.

1 (oder 2) ccm Blut, Serum oder Plasma werden mit 6 ccm Wasser und 1 (oder 2) ccm 20%iger Trichloressigsäure versetzt, gut umgeschüttelt und durch ein Faltenfilter in ein trockenes Gefäß filtriert (wenn die ersten Tropfen trüb sind, werden sie nochmals durch dasselbe Filter gegeben). Vom Filtrat werden 4 (bzw. 5) ccm (entsprechend 0,5 bzw. 1,0 ccm Ausgangsmaterial) in einem 100 ccm Erlenmeyerkolben mit etwas Wasser verdünnt und mit n/1-NaOH neutralisiert (der Verbrauch an Natronlauge beträgt bei Serum oder Plasma etwa 1 ccm, bei Vollblut etwa

0,6—0,7 ccm pro ccm im Filtrat enthaltener 20%iger Trichloressigsäure.[15])

Dann versetzt man die Lösung mit 5 ccm 5%iger Cadmiumsulfatlösung und 1,3 ccm n/1-Natronlauge, schüttelt gut um und läßt einige Minuten lang ruhig stehen. Der Niederschlag wird durch ein kleines Filter (*Schleicher* und *Schüll* Nr. 595 oder 597, 7 cm Durchmesser) abfiltriert und 4 mal mit verdünnter Cadmiumsulfatlösung (3—4 Tropfen der 5%igen Lösung in ca 80 bis 100 ccm Wasser) ausgewaschen. Dann gibt man in den Erlenmeyerkolben 0,5 ccm 2/n-Salzsäure und einige ccm Wasser und löst damit den zurückgebliebenen Rest des Niederschlags auf, setzt den Trichter mit der Hauptmenge des Niederschlags auf den Kolben, bringt den Niederschlag durch allmähliches Auftropfen von 4—5 ccm 2/n-Salzsäure in Lösung und wäscht das Filter mit ca. 20 ccm Wasser und 0,5 ccm 2/n-Salzsäure nach. Zu der salzsauren Lösung des Niederschlags gibt man 1 ccm 10%ige Natriumbromidlösung und 3 ccm m/1000 - Kaliumbromatlösung, verschließt den Kolben sofort mit einem gut passenden Gummistopfen, schüttelt um und läßt das Ganze 8 Minuten lang stehen. Dann versetzt man das Reaktionsgemisch mit 2,5 ccm kalt gesättigter gekundärer Natriumphosphatlösung und ca. 20 mg festem Jodkali, verschließt den Kolben sofort wieder und schüttelt etwa eine halbe Minute lang kräftig um. Das ausgeschiedene Jod wird nach Zusatz von 5 Tropfen 1%iger Stärke-Kochsalzlösung mit n/200-Thiosulfat titriert.

Ein vollständig durchgeführter Blindversuch ist bei Anwendung reiner Reagenzien entbehrlich und kann durch ein Gemisch von 5—6 ccm 2/n-Salzsäure, 20 ccm Wasser und 1 ccm Natriumbromidlösung ersetzt werden, das ebenfalls mit 3 ccm m/1000-Kaliumbromatlösung versetzt und wie beschrieben weiter verarbeitet wird.

Berechnung: Bezeichnet man die angewandte Menge Ausgangsmaterial mit a, den Verbrauch an n/200-Thiosulfit im Blindversuch mit b und den Verbrauch in Thiosulfat im Hauptversuch mit c (alles in ccm gerechnet), so ist $\frac{b-c}{a} \cdot 25{,}6 =$ mg% Glutathion.

[15]) Speichel wird am besten auf folgende Weise enteiweißt: Der Speichel wird gleich nach der Entnahme durch Zentrifugieren geklärt. 3 ccm des Zentrifugats werden mit 3 ccm Wasser und 3 ccm 10%iger Trichloressigsäure versetzt, gut umgeschüttelt und filtriert. Vom Filtrat werden 3 ccm (entsprechend 1 ccm Speichel) mit Wasser verdünnt, mit Natronlauge neutralisiert und wie angegeben weiter verarbeitet.

Bemerkung: Bei der Verarbeitung des Cadmiumhydroxyd-Niederschlags wird ein kleiner Teil des Glutathions durch den Sauerstoff der Luft dehydriert; dadurch entstehen aber keine erheblichen Fehler, da Glutathion gegen Luftsauerstoff nicht so empfindlich ist, wie vielfach angenommen wird. Bei einem gelegentlichen Versuch wurde durch eine Lösung von 0,5 mg Glutathion in 200 ccm n/1-Natronlauge $^1/_4$ Stunde lang ein lebhafter Luftstrom geleitet. Die nachfolgende Titration ergab 0,46 mg Glutathion = 92%, woraus sich leicht errechnen läßt, daß sogar unter diesen extremen Bedingungen nur 48% des vorhandenen Glutathions der Dehydrierung anheimgefallen waren. Man kann aber auch diesen kleinen Fehler noch vermeiden, wenn man in die salzsaure Lösung des Cadmiumhydroxyd-Niederschlages eine kleine Menge (0,05—0,10 g) Zinkstaub gibt, gut umschüttelt und das Bromnatrium und Kaliumbromat erst zugibt, wenn alles Zink restlos in Lösung gegangen ist.

2. Isolierung des Glutathions mittels Chlorsilber.

Erforderliche Lösungen: 20%ige Trichloressigsäure, 6%ige Kochsalzlösung (= ca. n/1), ca. n/1-Schwefelsäure, ca. n/1-Silberlactatlösung, 10%ige Natriumbromidlösung, m/1000-Kaliumbromat, ca. 2/n-Salzsäure, kaltgesättigte Na_2HPO_4-Lösung, Stärke-Kochsalzlösung und n/200-Thiosulfat.

Silberlactatlösung: 20 g käufliches Argent. lactit ($C_3H_5O_3Ag \cdot H_2O$; M.-G. = 215) werden in einer Mischung von 10 ccm konz. Milchsäure (d. = 1.21) und 80 ccm Wasser in der Hitze gelöst, die zunächst meist gelblich gefärbte Lösung solange gekocht, bis sie fast farblos oder trübe-grau geworden ist, und dann von dem sich immer abscheidenden metallischen Silber abfiltriert. Die Lösung bleibt auch in der Kälte stundenlang klar; über Nacht pflegt sich eine große Menge Silberlactat auszuscheiden, doch kann dieses durch Erwärmen leicht wieder in Lösung gebracht werden. Die Lösung (und auch das feste Salz) sind ungemein lichtempfindlich und müssen deshalb unter völligem Lichtabschluß aufbewahrt werden. Wenn sich aus der Lösung metallisches Silber ausgeschieden hat, so muß sie vor Gebrauch filtriert werden.

Die zu untersuchende Flüssigkeit wird wie bei 1. enteiweißt; das mit Wasser auf 10—15 ccm verdünnte Filtrat vom Eiweiß wird in einem 100 ccm-Erlenmeyerkolben mit 3 ccm 6%iger

Kochsalzlösung (= ca. n/1) und 7—8 ccm n/1-Schwefelsäure versetzt, mit 5 ccm Silberlactatlösung gefällt und etwa 1 Minute lang geschüttelt, sodaß sich der Niederschlag zusammenballt. Dann werden die Wände des Kolbens mit Wasser abgespült und der Kolben einige Minuten lang ins Dunkle beiseite gestellt. Wenn sich der Niederschlag abgesetzt hat,[16]) gießt man die überstehende Flüssigkeit vorsichtig möglichst restlos ab, ersetzt sie durch Wasser, schüttelt um, läßt sie stehen, bis der Niederschlag sich weiter abgesetzt hat und wiederholt dies solange, bis die abgegossene Flüssigkeit neutral gegen Lackmus reagiert. Der Niederschlag setzt sich um so rascher und vollkommener ab, je weiter das Auswaschen fortschreitet.) Dann gibt man auf den Niederschlag 10 ccm Wasser, zerteilt etwa vorhandene grobe Stücke mit einem Glasstab, versetzt mit 5 ccm 10%iger Natriumbromidlösung und schüttelt gut um. Nach kurzem Stehen gibt man 3 ccm m/1000-Kaliumbromatlösung und 5 ccm 2/Salzsäure zu, verschließt den Kolben sofort mit einem gut passenden Gummistopfen und läßt das Reaktionsgemisch 8 Minuten lang stehen. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Salzsäure durch Zusatz von 2,5 ccm kaltgesättigter sekundärer Natriumphosphatlösung abgestumpft, 1 g festes Jodkali zugegeben, der Kolben wieder verschlossen und etwa 1 Minute lang kräftig geschüttelt. Das ausgeschiedene Jod wird nach Zugabe von 20 Tropfen Stärke mit n/200-Thiosulfat titriert. (Während der Titration ist gut umzuschütteln; die letzten Tropfen müssen langsam zugegeben werden, weil sie sich nicht augenblicklich in der großen Niederschlagsmenge verteilen. Der Umschlag von graugrün in rein hellgelb ist so vollkommen scharf, daß die Unsicherheit der Titration höchstens einen Tropfen n/200-Thiosulfat beträgt. Bei künstlichem Licht ist die Titration allerdings nicht möglich. Ein Leerversuch ist immer erforderlich, da das Ergebnis der Titration etwas von der Beleuchtung abhängig ist.

[16]) In Gegenwart von Glutathion setzt sich Silberchlorid nur langsam ab; unter den angegebenen Bedingungen ist das Silberchlorid aber in relativ so großer Menge vorhanden, daß sich der Niederschlag gut weiter verarbeiten läßt. Die Dekantierung ist der Filtration nicht nur ihrer raschen Ausführbarkeit halber vorzuziehen, sondern auch deshalb, weil es beim Filtrieren des Silberchlorids erforderlich würde, das Filter ebenfalls in die Titrationsflüssigkeit zu verbringen, wodurch die Erkennung des Endpunktes der Titration wesentlich erschwert würde. Die Filter adsorbieren nämlich etwas Jod und etwas Stärke, färben sich dadurch blau und werden bei der Titration mit Thiosulfat nur sehr langsam entfärbt. — Die beim Dekantieren durch Abschwimmen von Halogensilber bedingten Verluste sind, wie zahlreiche Versuche gezeigt haben, so gering, daß sie nicht nachweisbar sind.

Berechnung: (Bezeichnung wie oben): $\frac{b-c}{a}$ 30,7 = mg% Glutathion.

2. Mikromethode.

Erforderliche Lösungen: 20%ige Trichloressigsäure, 5%iges Cadmiumsulfat, n/1-Natronlauge, 2/n-Salzsäure, m/1000-Kaliumbromat, 10%iges Natriumbromid, kalt gesättigte Lösung von sekundärem Natriumphosphat, Stärkelösung, n/1000-Natriumthiosulfat.

0,1 (0,05) ccm Blut wird gut mit 0,1 (0,05) ccm 20%iger Trichloressigsäure gemischt und zentrifugiert. Zu der überstehenden Flüssigkeit, die vollkommen klar sein muß, gibt man 0,8 (0,9) ccm Wasser, mischt gut durch und zentrifugiert wieder. (Anders lassen sich so kleine Mengen Blut nicht einwandfrei mit Trichloressigsäure enteiweißen.) Vom klaren Zentrifugat werden 0,5 ccm (entsprechend 0,05 [0,025] ccm Blut) in einem Becherglas von 50 ccm Inhalt mit 2—3 ccm Wasser, 2,5 ccm 5%iger Cadmiumsulfatlösung und 0,6 ccm n/1-Natronlauge versetzt, der Niederschlag nach kurzem Stehen durch ein Filter von 5½ cm Durchmesser abfiltriert und 4 mal mit verdünnter Cadmiumsulfatlösung nachgewaschen. Dann setzt man den Trichter auf ein weites, kurzes Reagensglas (ca. 25 : 120 mm), löst den Niederschlagsrest im Becherglas in 0,5 ccm 2/n-Salzsäure, gießt diese Lösung durch das Filter mit dem Niederschlag, bringt diesen mit etwa 2,55 ccm Salzsäure in Lösung und wäscht das Becherglas und das Filter mit ca. 2—3 ccm Wasser nach. Zu der Lösung des Niederschlags gibt man 3 Tropfen 10½ige Natriumbromidlösung und 2 ccm m/10.000-Kaliumbromatlösung, verschließt das Gefäß sofort mit einem gut passenden Gummistopfen, gibt nach 8 Minuten 1,5 ccm kaltgesättigte Na_2HPO_4-Lösung und einige Milligramm feinpulverisiertes Jodkali zu, verschließt wieder, schüttelt gut um und titriert nach Zusatz von 1 Tropfen Stärke-Kochsalzlösung das ausgeschiedene Jod mit n/1000-Thiosulfat. Ein Leerversuch ist stets erforderlich, kann aber auch analog wie bei der Makromethode in abgekürzter Form durchgeführt werden.

Berechnung: $\frac{b-c}{}$ 51,2 = mg% Glutathion.

Eine Anzahl von Kontroll-Analysen sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt.

Material	Angew. Menge ccm	Methode	Gefundenes Glut.		Gegeb. bzw. zuges. mg. Glut.	Insges. gefund. mg. Glut.	Gefund. bzw. wiedergef. mg. Gl.	Fehler	
			mg	entspr mg %				in mg Glutathion	in % des Zusatzes
Aq. dest.		$Cd(OH)_2$			0,20		0,202	+ 0,002	+ 1,0
"		"			0,50		0.478	— 0,022	— 4,4
"		"			0,60		0,590	— 0,010	— 1,7
"		"			0,60		0,590	— 0,010	— 1,7
"		AgCl			0,50		0,480	— 0,020	— 4,0
"		"			0,50		0,450	— 0,050	—10,0
"		"			0,50		0,490	— 0,010	— 2,0
Speichel	1,0	$Cd(OH)_2$	0,154	15,4	0,39	0,520	0,370	— 0,020	— 5,1
"	0,75	AgCl	0,270	s.Anm	0,50	0.785	0,515	+ 0,015	+ 3,0
Plasma A.	1,0	$Cd(OH)_2$	0,065	6,5	0,50	0,480	0.415	— 0,085	— 17,0
Plasma B.	0,67	AgCl	0,052	7,8*	0,33	0,374	0,322	— 0,008	— 2,4
"	0,67	$Cd(OH)_2$	0,120	18,0*	0,33	0,420	0,300	— 0,030	— 9,1
Plasma C.	0,10	Mikro $Cd(OH)_2$	0,0128	12,8*	0,0200	0,0323	0,0195	— 0,0005	— 2,5
"	0,875	$Cd(OH)_2$	0,125	14,3*					
"	0,800	AgCl	0,077	9,6*					
Vollblut A.	1,0	$Cd(OH)_2$	0,458	45,8					
"	1,0	AgCl	0,490	49,0					
"	0,05	Mikro-$Cd(OH)_2$	0,026	52,0					
"	0,45	nach Tunnicliffe (z. Vergl.)	0.32	71,0					

Anmerkung. Da bei diesem Versuch das im Speichel enthaltene Rhodan als Glutathion miterfaßt wurde, ist eine Umrechnung in mg% unterblieben. Der Versuch wurde nur ausgeführt, um festzustellen, ob zugesetztes Glutathion auch im Speichel nach der Silberchlorid-Methode richtig wiedergefunden wird.

* Wie bereits im Text erwähnt, werden bei der Fällung des Glutathion mit $Cd(OH)_2$ noch andere Substanzen mitbestimmt; man erhält deswegen im Plasma nach der $Cd(OH)_2$-Methode immer etwas höhere Werte, als nach der AgCl-Methode. Eine so große Differenz, wie im Falle des Plasmas B, ist sonst nie mehr zur Beobachtung gekommen.

Herrn Professor Dr. O. Loos danke ich für die freundliche Ueberlassung des Themas.

Herrn Dr. Fr. Hartner möchte ich für die liebenswürdige Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Literatur-Angaben.

1. Rupp und Schied, Ber. d. d. chem. Ges. 2191 (1902).
2. Mikrochemie XVI (1934), Fußnote S. 147.
3. Dissertation Amter (1934), Frankfurt a. M.
4. Lorant, H.-S. 200, 121 (1931).
5. Okuda, zit. nach Lorant.
6. Fujita und Iwatake, Biochem. Ztschr. 242, 42 (1931).
7. Hartner, Patentanmeldung 5. Oktober 1934.
8. Treadwell, Lehrb. d. analyt. Chemie, 8. Aufl., Bd. 2, S. 600.

Lebenslauf.

Ich wurde am 2. März 1907 in Seligenstadt (Hessen) als Sohn des Gastwirts Eugen Schleiß und seiner Ehefrau Eva Maria geb. Zöller geboren. Ich besuchte das Progymnasium dortselbst, dann die Oberrealschule in Offenbach a. M. und legte Ostern 1928 an der Oberrealschule in Dieburg meine Reifeprüfung ab. Nach einem Studium der Naturwissenschaften an den Universitäten Frankfurt a. M. und Gießen wechselte ich im Wintersemester 1931/32 zum Studium der Zahnheilkunde in Frankfurt a. M. über. Ich bestand mein zahnärztliches Vorexamen im Frühjahr 1933 und mein zahnärztliches Staatsexamen im Herbst 1934. Nach meiner Promotion am 10. Mai 1935 war ich in der freien Praxis als Vertreter und Assistent tätig und habe mich am 27. April 1936 in Jügesheim als Zahnarzt niedergelassen.